

PEPTIDE HAVING FUNCTION TO SUPPRESS TRANSCRIPTION OF GENE

Patent number: JP2001269179
Publication date: 2001-10-02
Inventor: TAKAGI MASARU; SHINSHI HIDEAKI; OTA MASARU
Applicant: NATL INST OF ADVANCED INDUSTRIAL SCIENCE & TECHNOLOGY METI
Classification:
- **international:** C12N15/09; A01H5/00; C07K14/415; C12N1/15; C12N1/19; C12N1/21; C12N5/10
- **europaean:**
Application number: JP20000087560 20000327
Priority number(s):

Abstract of JP2001269179

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a peptide derived from a higher plant having a function to bond to a DNA and suppress the transcription of gene, a gene coding for the peptide, a recombinant vector containing the gene and a transformant containing the recombinant vector.

SOLUTION: This invention relates to a peptide composed of the amino acid sequence (a) expressed by the sequence No.1 (refer to the specification) and a peptide composed of the amino acid sequence (a) wherein one or plural amino acids are deleted, substituted or incorporated provided that the peptide has a function to suppress the transcription of the gene.

Data supplied from the esp@cenet database - Patent Abstracts of Japan

BEST AVAILABLE COPY

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-269179

(P2001-269179A)

(43) 公開日 平成13年10月2日 (2001. 10. 2)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
C 1 2 N 15/09	Z N A	A 0 1 H 5/00	A 2 B 0 3 0
A 0 1 H 5/00		C 0 7 K 14/415	4 B 0 2 4
C 0 7 K 14/415		C 1 2 N 1/15	4 B 0 6 5
C 1 2 N 1/15		1/19	4 H 0 4 5
1/19		1/21	
審査請求 有 請求項の数 5 O L (全 11 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2000-87560 (P2000-87560)

(22) 出願日 平成12年3月27日 (2000. 3. 27)

(71) 出願人 301000011

経済産業省産業技術総合研究所長
東京都千代田区霞が関1丁目3番1号

(72) 発明者 高木 優

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 進士 秀明

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

(72) 発明者 太田 賢

茨城県つくば市東1丁目1番3 工業技術
院生命工学工業技術研究所内

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド

(57) 【要約】

【課題】 DNAに結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供する。

【解決手段】 (a) 配列番号1で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は (b) アミノ酸配列 (a) において1若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 (a) 配列番号 1 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は (b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【請求項 2】 (a) 配列番号 2 で表されるアミノ酸配列からなるペプチド、又は (b) アミノ酸配列 (a) において 1 若しくは数個のアミノ酸が欠失、置換若しくは付加されたアミノ酸配列からなる遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド。

【請求項 3】 請求項 1 又は 2 に記載のペプチドをコードする遺伝子。

【請求項 4】 請求項 3 に記載の遺伝子を含有する組み換えベクター。

【請求項 5】 請求項 4 に記載の組み換えベクターを含む形質転換体。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】 本発明は、遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体に関する。

【0002】

【従来の技術】 植物ホルモン、エチレンに応答するシス制御エレメントに結合するタンパク質因子 ERF (Ethylene Responsive Element binding Factor) は、ERF ドメインと名付けた DNA 結合ドメインを有する植物特有の転写因子である。最近の研究から、ERF タンパク質をコードする遺伝子は、マルチジーンファミリーを構成していることが明らかになっている。これまでに、タバコ、シロイヌナズナ植物から ERF ドメインを有するタンパク質因子をコードする cDNA が明らかにされているが、本発明者らはさらに、タバコ、イネ、シロイヌナズナの cDNA について機能解析を行い、植物細胞内でリプレッサーとして機能するドメインを明らかにし、本発明を完成した。

【0003】

【発明が解決しようとする課題】 すなわち、本発明は DNA に結合し遺伝子の転写を抑制する機能を有する高等植物由来のペプチド、該ペプチドをコードする遺伝子、該遺伝子を含有する組み換えベクター及び該組み換えベクターを含む形質転換体を提供することを目的とする。

【0004】

【課題を解決するための手段】 本発明者らは、タバコ、イネ、シロイヌナズナの cDNA について機能解析を行った結果、ERF 因子のカルボキシ末端領域のアスパラギン酸-ロイシン-アスパラギン (DLN) からなるモチーフを有する領域が、遺伝子の転写を抑制する機能を有することを発見し、本発明を完成した。このような D

LNモチーフを有し遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドとしては、例えばタバコ由来の ERF3 に含まれるペプチド；シロイヌナズナ由来の AtERF3、AtERF4、AtERF7 及び AtERF8 に含まれるペプチド；イネ由来の osERF3 (配列番号 1) に含まれるペプチドが挙げられる。

【0005】

【発明の実施の形態】 機能解析の方法は、それぞれの ERF 因子をコードしている cDNA から、タンパク質コード領域を切り出し、これを酵母の GAL4 転写因子の DNA 結合ドメインをコードしている領域と結合し、さらに植物細胞で機能するカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターの下流につないでエフェクタープラスミドを構築する。これを GAL4 タンパク質結合部位をプロモーター領域に結合した、ルシフェラーゼ遺伝子からなるリポーター遺伝子と同時に、タバコ培養細胞あるいはシロイヌナズナ葉にエレクトロポーション法により導入し、リポーター遺伝子であるルシフェラーゼ遺伝子の活性を測定することによって調べた。

【0006】 つぎに、リプレッサー因子に存在するリプレッサー機能を有する領域であるリプレッサードメインを同定するために、各遺伝子のコード領域を削除する方法であるディリーション解析法を用いて、ERF 因子のどの領域にリプレッサードメインが存在するのかを調べた。

【0007】

【実施例】 イネ osERF3 遺伝子の単離

塩基配列が決定されているタバコの ERF3 遺伝子のアミノ酸配列をもとに BLAST プログラムでデータベースを探索し、と ERF3 と相同性を持つイネの cDNA 配列を探索した。ERF3 と相同性を示すイネ cDNA クローン C1255 を農業生物資源研究所より譲渡を受け、全塩基配列を決定した。配列番号 1 に示す osERF3 の cDNA の全長配列を持つプラスミドを posERF3 と名付けた。

【0008】 osERF3 リプレッションドメインの同定
エフェクタープラスミドの構築

(osERF3 全長を含むエフェクタープラスミド pGAL4DB-osERF3 の構築：図 1) クローンテック社製 (Clontech 社, USA) のプラスミド pBI221 を制限酵素 XhoI と SacI で切断し、T4 ポリメラーゼで平滑末端処理した後、アガロースゲル電気泳動で GUS 遺伝子を除き、カリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (以下 CaMV35S) とノバリン合成酵素遺伝子の転写終止領域 (Nosターミネーター、以下 Nos-ter) を含む 35S-Nos プラスミド断片 DNA を得た。クローンテック社製の pAS2-1 ベクターを制限酵素 HindIII で消化し、酵母 GAL4 タンパク質の DNA 結合領域 (1-147 アミノ酸残基) をコードする 748 bp の DNA 断片 (以下 GAL4DBD) をアガロースゲル電気泳動によって単離した後、T4 DNA ポリメラーゼで平滑末端処理をした。この GAL4DBD を含む DNA 断片を、先ほどの 35S-Nos の DNA の

35SプロモーターとNosターミネーター間の平滑末端にした部位に挿入し、35Sプロモーターに対して酵母 GAL4 タンパク質のDNA 結合領域の ORF が順方向に並んでいるものを選抜してp35S-GAL4DBD ベクターを構築した。

【0009】osERF3のcDNAプラスミドposERF3と、GAL4D BDと読み枠（フレーム）が一致するように設計した5末アッププライマーprimer1（配列番号3：osERF3塩基配列1-20に結合）GATGGCGCCGAGAGCAGCTACと制限酵素Sal I部位を持つ3末ロープライマーprimer2（配列番号4：osERF3塩基配列685-708に結合）GTCGACCTAGTTCTCTACCGCGGCGGCGCを用いてosERF3全タンパク質コード領域（配列番号1：osERF3塩基配列1-708；アミノ酸配列1-235）をPCR法によって増幅し、DNA断片を得た。PCR反応の条件は、変性反応94℃1分、アニール反応℃47℃2分、伸長反応74℃1分を1サイクルとして25サイクルおこなった。以下全てのPCR反応は同じ条件でおこなった。得たDNA断片を制限酵素Sal Iで消化した後、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このosERF3をコードするDNA断片を、制限酵素Sma IとSal Iで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-osERF3を構築した。

【0010】（osERF3アミノ酸193/235を含むエフェクタープラスミドpGAL-193/235osERF3の構築）posERF3プラスミドとGAL4DBDをコードするフレームと読み枠が一致するように設計した5末アッププライマーprimer3（配列番号5：結合部位osERF3塩基配列575-600）GCGGCGGTTGCAACAAGTGACTCCと制限酵素Sal I部位を持つ3末ロープライマーprimer2（配列番号4：結合部位osERF3塩基配列685-708）GTCGACCTAGTTCTCTACCGCGGCGGCGCを用いてosERF3のアミノ酸配列193/235コード領域に該当する塩基配列575-708の領域を含むDNA断片をPCR法によって得た。このDNA断片を制限酵素Sal Iで消化し、アガロース電気泳動によって目的とするDNA断片を単離した。このosERF3のアミノ酸配列193/235にコードするDNA断片（DNA領域575-708）を、制限酵素Sma IとSal Iで予め消化しておいた35S-GAL4DBDプラスミドに組み込み、エフェクタープラスミドpGAL-141/185osERF3を構築した。

【0011】（レポーター遺伝子の構築：図2及び図3）プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221（クローンテック社）を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter（nopaline synthase terminator）を領域含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター-TATAボックスを含む相補鎖のDNA 1（配列番号6）AGCTTAGACTCTGCAAGACCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCATTGGAGAGGACACGCTG及びDNA 2（配列番号7）GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAATGAACCTCCTTATATAGAGGAAGGGTCTTGCAGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2分加熱

した後、60℃で1時間加熱し、その後室温（25℃）で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記の手順は、図2に示した。

【0012】このプラスミドを制限酵素SstIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなう。ホタル・ルシフェラーゼ遺伝子（LUC）をもつプラスミドベクターPGV-CS2（東洋インキ社製）を制限酵素XbaIとNcoIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、アガロースゲル電気泳動によって、ルシフェラーゼ遺伝子を含む1.65 kbのDNA断片を単離精製した。このDNA断片を上記のTATAボックスとNosターミネーターを含むプラスミドに挿入しTATA-LUCリポーター遺伝子を構築した。酵母のGAL4タンパク質のDNA結合配列を5コピー持つプラスミドpG5CAT（Clontech社製）を制限酵素SmaIとXbaIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなった後、5コピーのGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片をアガロースゲル電気泳動で精製した。TATA-LUCベクターを制限酵素BglIIで消化し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理をおこなう。この部位に平滑末端化した5コピーのGAL4タンパク質のDNA結合配列を含むDNA断片を挿入し、得られたプラスミドのうちGAL4タンパク質のDNA結合配列が順方向に向いているものを選抜し、リポーター遺伝子GAL4-LUCを構築した。（図3参照）

【0013】（レファレンス遺伝子の構築）ウミシイタケ由来のルシフェラーゼ遺伝子をもつプロメガ社製カセットベクターpRL-nullを制限酵素NheIとXbaI制限酵素で切断し、T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化処理を行った後、アガロースゲル電気泳動でウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子を含む948 bpのDNA断片を精製する。このDNA断片をエフェクタープラスミドの構築の際に用いたGUS遺伝子を除いたpBI221ベクターのGUS遺伝子があった領域に挿入する。得られたプラスミドのうち、ウミシイタケ・ルシフェラーゼ遺伝子が順方向に向いているものを選抜する（pPTRLの構築）。

【0014】（レポーター遺伝子の活性測定法）タバコ培養細胞プロトプラストにリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドをエレクトロポレーション法を用いて導入し、エフェクターの効果のリポーター遺伝子の活性を測定することによって調べた。

（プロトプラストの調製法）100 mLのMS培地（ムラシゲ・スクーグ培地用混合塩類、日本製薬社製、3%シヨ糖、0.2 g/L KH₂PO₄、0.2 g/L m-inositol、2 mg/L glycine、1 mg/L 塩酸チアミン、0.2 mg/L 2, 4-D、pHを5.8に調節する）に7日間培養したタバコ培養細胞BY-2の前培養液3 mLを加えて26℃で3日間暗所で培養した細胞を金属製のメッシュ（目の開きが125 μm、

東京スクリーン社製)濾過回収し、0.4M マニトールを含む MS 培地で細胞を洗浄する。洗浄した細胞を 25 mL の 0.4 M マニトールを含む MS 培地に懸濁して 10 分間室温で放置 3,000 rpm で 1 分間遠心して細胞を回収する。この細胞を 20 mL の 1% セルラーゼ (オノヅカ RS.) と 0.1% ペクトリアーゼ Y-23 (セイシン社製) を含む MS 培地に細胞を再懸濁して、26°C で 90 分間暗所で 60 rpm で回転振とうしながら細胞壁を消化する。その後、1,000 rpm で 5 分間遠心してプロトプラストを回収する。

【0015】(エレクトロポレーションによる遺伝子導入) 上記で得たプロトプラストを濃度が 2.5×10^6 細胞/mL になるようにエレクトロポレーション緩衝液 (5 mM MES pH5.8, 70 mM KCl, 0.3 M マニトール) に再懸濁する。エレクトロポレーション用キュベット (ジーンパルサーキュベット 0.4 cm electrode, バイオラッド社製) に構築した pGAL4-LUC レポーター遺伝子とエフェクタープラスミドとして pGALDB-osERF3 あるいはそのデレションシリーズ (pGALDB-1/25osERF3~pGALDB-204-225osERF3) の DNA を各 10 μ g と リファレンス遺伝子プラスミド 1 μ g を 100 μ L の 2X エレクトロポレーション緩衝液 (10 mM MES pH5.8, 140 mM KCl, 0.6 M マニトール) を加えて、滅菌水で全量を 200 μ L にする。キュベットに 600 μ L のプロトプラスト懸濁液を入れて、エレクトロポレーター (Genepulser II Electroporation System/バイオラッド社製) を用いて 600 V, 25 mF の条件で DNA を導入する。導入後、キュベットからプロトプラストを 1,000 rpm で 5 分間遠心して回収し、5 mL の 0.4 M マニトールを含む MS 培地にプロトプラストを再懸濁して、26°C で 6 時間暗所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

【0016】(ルシフェラーゼ活性測定) 6 時間静置したプロトプラスト懸濁液を 1 mL 採取して、2,000 rpm で 3 分間遠心してプロトプラストを回収した後、Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) に添付されている Passive Lysis Buffer 50 μ L に懸濁する。プロトプラストを破碎した後、遠心して上清を回収する。この細胞抽出液を 5 μ L 用いて Dual-Luciferase™ Reporter Assay System (Promega 社製) とルミネッセンスリーダー (BLR-201, アロカ社製) を用いてルシフェラーゼ活性測定を行なった。ホタル・ルシフェラーゼおよびウミシイタケ・ルシフェラーゼ活性の測定を測定キットの説明書に従って 10 秒間の発光を積分モードでカウントした。リファレンス遺伝子の活性値をレポーター遺伝子の活性値で割り、その相対値である Relative luciferase activity を測定値として求めた。エフェクターを入れない場合の相対値を 100 として、エフェクタープラスミドを同時に細胞に導入したときにレポーター遺伝子の活性値の変動によってエフェクターの効果を調査した。すなわち、pGAL4-LUC レポーター遺伝子

と pGALDB-osERF3 エフェクタープラスミドを導入したときのレポーターの活性値が減少することから、pGALDB-osERF3 は、レポーター遺伝子の活性を抑制する効果 (リプレッサー機能) があることを示している。以下、レポーターの活性値を測定して、レポーターの相対活性値が 100 以下になる場合に、導入したエフェクターにはリプレッサー機能が存在するので、どのエフェクターがリプレッサーとして機能するのかをレポーターの活性を測定することによって調べた。

【0017】(リプレッサードメインの同定) アラビドプシス osERF3 の遺伝子の転写制御に関わる機能を解析するため、レポーター遺伝子 pGAL4-LUC と pGALDB-osERF3 をタバコ培養細胞より調整したプロトプラストにエレクトロポレーション法によって導入し、レポーター遺伝子の活性を調べた。その結果、pGAL-osERF3 エフェクターは、レポーター遺伝子の活性をエフェクターを導入しないレポーター遺伝子の場合 (コントロール) に比べ 50% 減少させた。対照実験としておこなった osERF3 のコード領域を含まない p35S-GALDBD は、レポーター遺伝子の活性に影響を及ぼさなかった。このことは、osERF3 が転写を抑制するリプレッサーとして機能していることを示している。

【0018】次に、osERF3 遺伝子のタンパク質コード領域をディレクションした DAN 断片もつエフェクタープラスミド、pGAL-193/235osERF3 が、レポーター遺伝子の活性を抑制する機能をもつかを調べた。pGAL-141/185osERF3 エフェクタープラスミドをレポーター遺伝子と共にタバコ培養細胞に導入し、レポーター遺伝子の活性を測定した結果、pGAL-193/235osERF3 エフェクターは、pGALDB-osERF3 を導入した場合と同様に、レポーター遺伝子の活性をコントロールに比べ、約 40% に抑えるリプレッサー機能があることが示された。(図 4B)。この結果から、osERF3 のリプレッサー機能を持つ領域 (リプレッションドメイン) は、osERF3 のアミノ酸配列、141/185 に存在することを明らかにした (図 4B)。このアミノ酸配列を配列番号 2 に示した。

【0019】本発明の遺伝子の転写を抑制する機能を有するペプチドは、例えばガン遺伝子の転写調節領域に特異的に結合する DNA 結合タンパク質と融合させて、細胞内で発現させることにより、ガン遺伝子の発現を効率的に抑制することが可能となる。また、リプレッサー機能は調べたところ遺伝子に非特異的であるが、DNA との結合が必要であることから、特定の DNA に結合する DNA 結合ドメインと融合することにより、遺伝子特異的あるいは非特異的に転写を抑制することが可能となる。このことによって、例えば色素代謝系の酵素をコードする遺伝子の発現を制御することが可能となり、これまでには得られなかった色違いの花弁を有する花を創作することができる。また、アレルゲンとなるタンパク質の発現を抑制することによって、アレルゲンの少ない食

物の生産も可能となる。

【配列表】

【0020】

SEQUENCE LISTING

<:110>:Secretary of Agency of Industrial Science and Technology

<:120>:Novel repression domain of plant specific transcription factor

<:130>:

<:160>: 7

<:210>: 1

<:211>: 741

<:212>: DNA

<:213>: oriza sativa

<:400>:1

atg gcg ccc aga gca gct acg gtg gag aag gtt gct gtg gcg cca ccc	48
Met Ala Pro Arg Ala Ala Thr Val Glu Lys Val Ala Val Ala Pro Pro	
5 10 15	
acc ggg ctt ggt ctt ggc gtc ggc gga ggt gtc gga gcc ggg ggt cct	96
Thr Gly Leu Gly Leu Gly Val Gly Gly Gly Val Gly Ala Gly Gly Pro	
20 25 30	
cac tac agg ggc gtc cgc aag cgc ccg tgg ggg cgt tac gca gcg gag	144
His Tyr Arg Gly Val Arg Lys Arg Pro Trp Gly Arg Tyr Ala Ala Glu	
35 40 45	
atc cgt gac cct gcc aag aag agc cgg gtg tgg ctc ggt acc tac gac	192
Ile Arg Asp Pro Ala Lys Lys Ser Arg Val Trp Leu Gly Thr Tyr Asp	
50 55 60	
acg gca gag gag gcc gcc cgc gcc tac gac gcc gcc gct cga gag ttc	240
Thr Ala Glu Glu Ala Ala Arg Ala Tyr Asp Ala Ala Ala Arg Glu Phe	
65 70 75 80	
cgg ggt gcc aag gca aaa aca aac ttt ccg ttt gca tca cag tcg atg	288
Arg Gly Ala Lys Ala Lys Thr Asn Phe Pro Phe Ala Ser Gln Ser Met	
85 90 95	
gtc ggc tgt ggc ggc agc ccc agc agc aat agc acg gta gac acc ggt	336
Val Gly Cys Gly Gly Ser Pro Ser Ser Asn Ser Thr Val Asp Thr Gly	
100 105 110	
ggc ggc ggg gtt cag acg cct atg cgg gcc atg cct ctg ccg ccg act	384
Gly Gly Gly Val Gln Thr Pro Met Arg Ala Met Pro Leu Pro Pro Thr	
115 120 125	
ctg gac ttg gat ttg ttc cac cgc gcg gct gct gtg act gca gtc gcc	432

Leu Asp Leu Asp Leu Phe His Arg Ala Ala Ala Val Thr Ala Val Ala
 130 135 140
 ggc acc ggc gtt cgc ttt cct ttc aga gga tat ccc gtt gca cgt cca 480
 Gly Thr Gly Val Arg Phe Pro Phe Arg Gly Tyr Pro Val Ala Arg Pro
 145 150 155 160
 gca acg cat cct tac ttt ttc tat gag cag gct gca gcg gct gcc gca 528
 Ala Thr His Pro Tyr Phe Phe Tyr Glu Gln Ala Ala Ala Ala Ala
 165 170 175
 gct gag gct gga tac cgt atg atg aag ctt gca ccg ccg gtc acc gtg 576
 Ala Glu Ala Gly Tyr Arg Met Met Lys Leu Ala Pro Pro Val Thr Val
 180 185 190
 gcg gcg gtt gca caa agt gac tcc gac tcc tcg tcg gtg gtt gat ctc 624
 Ala Ala Val Ala Gln Ser Asp Ser Asp Ser Ser Ser Val Val Asp Leu
 195 200 205
 gcg ccg tca cct cca gcg gtt acg gcg aac aag gcg gca gct ttc gat 672
 Ala Pro Ser Pro Pro Ala Val Thr Ala Asn Lys Ala Ala Ala Phe Asp
 210 215 220
 ctg gat ctg aac cgg ccg ccg ccg gta gag aac tag ctc agg atg ggt 720
 Leu Asp Leu Asn Arg Pro Pro Pro Val Glu Asn *** Leu Arg Met Gly
 225 230 235 240
 tag ctg acg act ttg tag ttt 741
 *** Leu Thr Thr Leu ***
 245

<:210>: 2
 <:211>: 43
 <:212>: RPT
 <:213>: oriza stativa

<:400>:2
 Ala Ala Val Ala Gln Ser Asp Ser Asp Ser Ser Ser Val Val Asp Leu
 5 10 15
 Ala Pro Ser Pro Pro Ala Val Thr Ala Asn Lys Ala Ala Ala Phe Asp
 20 25 30
 Leu Asp Leu Asn Arg Pro Pro Pro Val Glu Asn
 35 40

<:210>: 3
 <:211>: 21
 <:212>: DNA
 <:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 3
gatggcgccc agagcagcta c

<:210>: 4
<:211>: 29
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 4
gtcgacctag ttctctaccg gcggcgggcc

<:210>: 5
<:211>: 23
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 5
gcggcggttg cacaagtgc tcc

<:210>: 6
<:211>: 65
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 6
agcttagatc tgcaagaccc ttctctata taaggaagtt catttcattt ggagaggaca
10 20 30 40 50 60
cgctg
65

<:210>: 7
<:211>:
<:212>: DNA
<:213>: Artificial Sequence

<:223>: Description of Artificial Sequence: Synthetic primer DNA

<:400>: 7
gatccagcgt gtctctcca aatgaaatga acttccttat atagaggaag ggtcttgacg
10 20 30 40 50 60
atcta
65

【図面の簡単な説明】

【図1】プラスミドpBI221からpGALDB-osERF3を構築す

る手順を示す図である。

【図2】レポーター遺伝子GAL4-LUC を構築する手順の

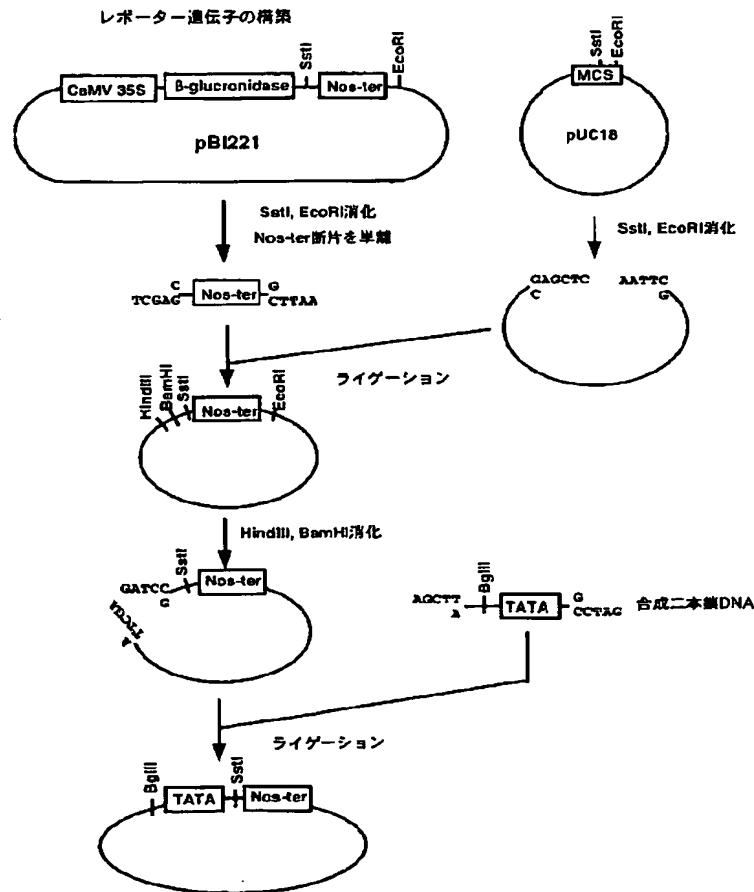
前半部を示す図である。

【図3】図2に引き続きレポーター遺伝子GAL4-LUCを構築する手順の後半部を示す図である。

【図4】Aはリポーター遺伝子とエフェクタープラスミドを示す図である。図において、5XGAL4: GAL4転写因子DNA結合配列、TATA: CaMV35SプロモーターTATAボックスを含む領域、LUC: ルシフェラーゼ遺伝子、CaMV 35S: カリフラワーモザイクウイルス35Sタンパク質遺伝子プロモーター、GAL4 DB: 酵母GAL4転写因子DNA結合ドメインコード領域、Nos: ノパリン合成酵素遺伝子転写終止領域を表す。BはosERF3およびosERF3のディリーションが

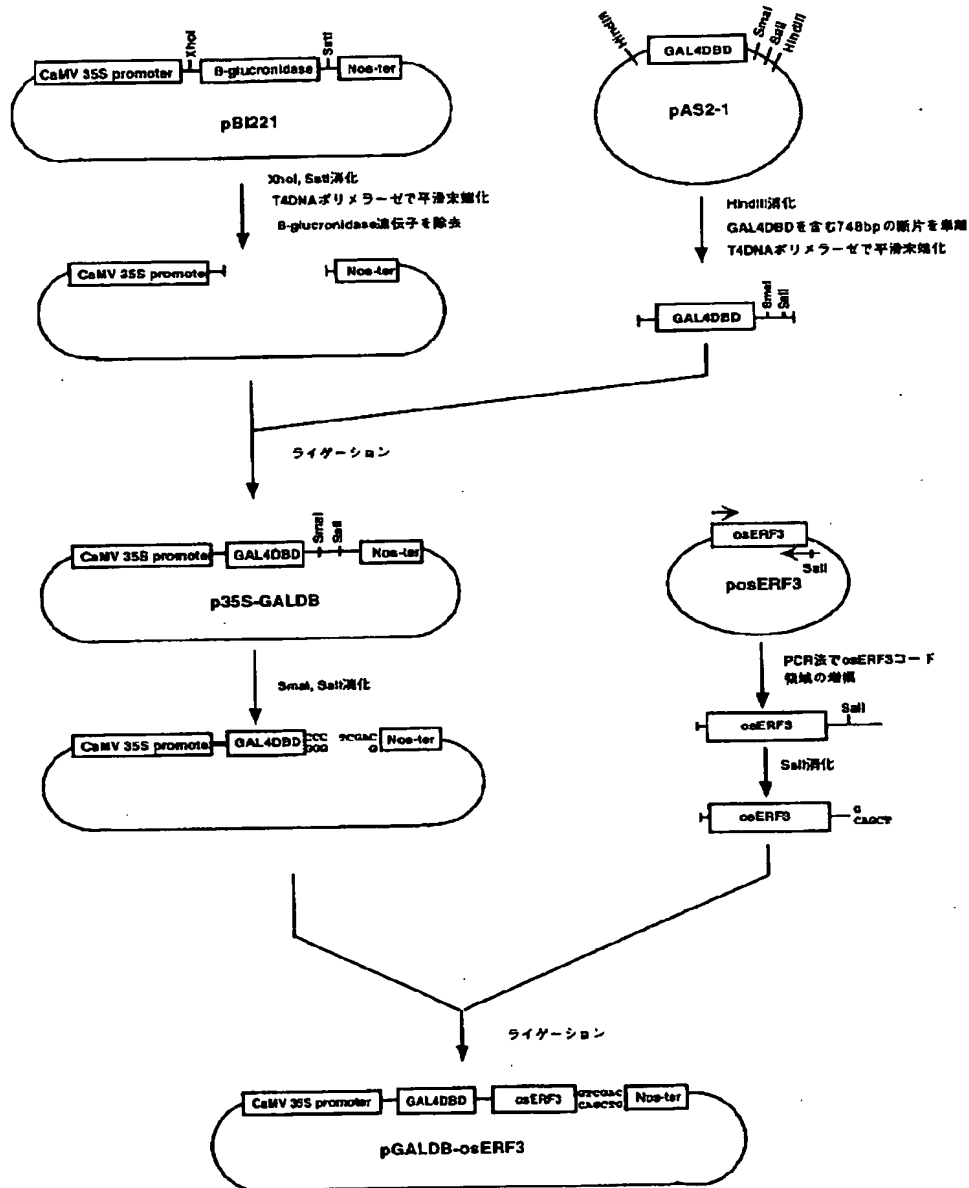
リポーター遺伝子の活性(Relative Activity)に及ぼす影響を示す図である。図において、左の数字(193/235)は、osERF3のアミノ酸領域を示す。真ん中のボックスは左の数字に該当するアミノ酸配列領域を示す。右のグラフは、左の領域をもつエフェクタープラスミドを導入したときのリポーター遺伝子の活性を示す。エフェクターを入れないときのリポーター遺伝子の活性を100とした。osERF3およびosERF3ディリーションのエフェクターでアミノ酸配列193/235を持つエフェクターがリポーター遺伝子の活性を40%に減少させ、転写を抑制する効果を持つことが示されている。

【図2】

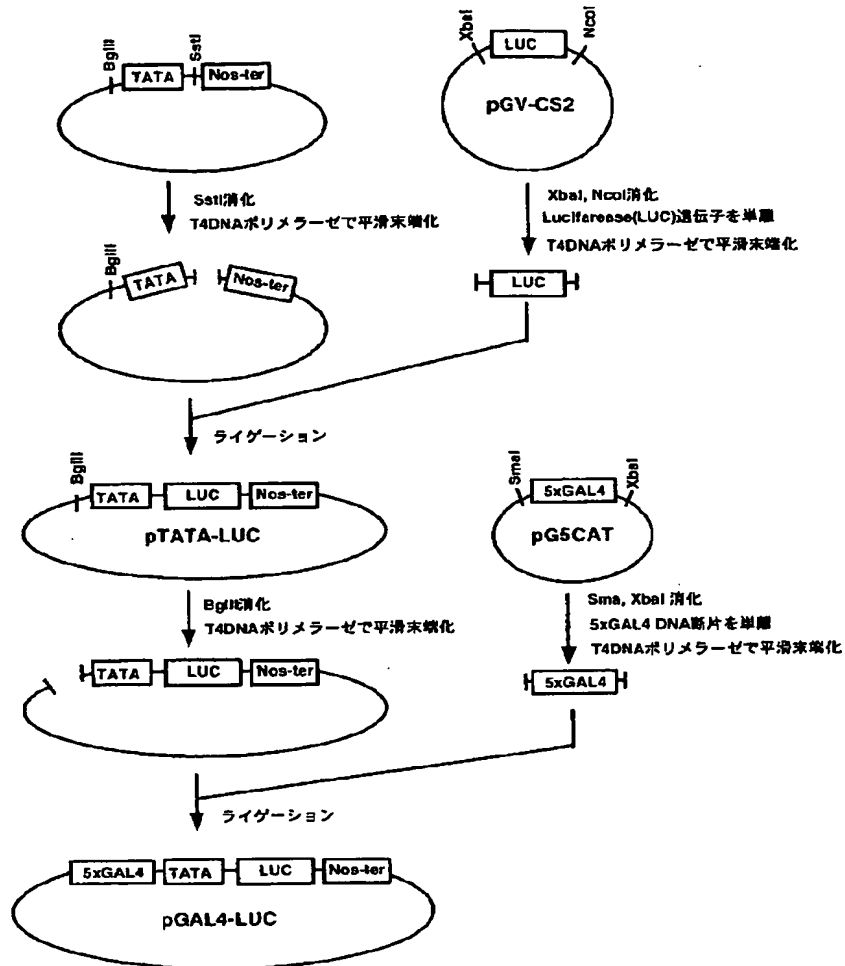


【図1】

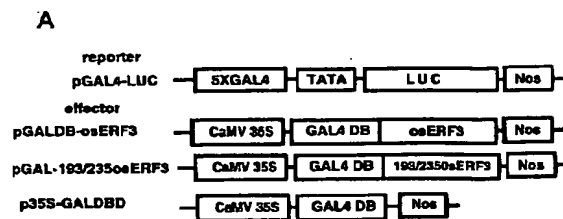
エフェクタープラスミドの構築



【図3】



【図4】



【手続補正書】

【提出日】平成12年4月11日(2000. 4. 1)

1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0011

【補正方法】変更

【補正内容】

【0011】(レポーター遺伝子の構築: 図2及び図3) プラスミドpUC18を制限酵素EcoRIとSstIで消化する。pBI221(クローンテック社)を制限酵素EcoRIとSstIで消化し、Nos-ter(nopaline synthase terminator)を領域含む270bpのDNA断片を挿入するアガロースゲル電気泳動によって単離する。得られた断片を制限酵素EcoRIとSstIで消化しておいたプラスミドpUC18のEcoRI-SstI部位に挿入する。カリフラワーモザイクウイルス35SプロモーターTATAボックスを含む相補鎖のDNA1(配列番号6) AGCTTAGATCTGCAAGACGCTTCCTCTATATAAGGAAGTTCATTTCAATTTGGAGAGGACACGCTG及びDNA2(配列番号7) GATCCAGCGTGTCTCTCCAAATGAAATGAACTTCCTTATATAGAGGAAGGCTCTTGAGATCTAを合成する。合成したDNAを90℃2分加熱した後、60℃で1時間加熱し、その後室温(25℃)で2時間静置してアニーリングさせ2本鎖を形成させる。Nos-terを持つpUC18プラスミドを制限酵素HindIIIとBamHIで消化する。合成した2本鎖DNAをpUC18のHindIII-BamHI部位に挿入し、TATA-boxとNos-terを含むプラスミドを構築する。上記の手順は、図2に示した。

【手続補正2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0015

【補正方法】変更

【補正内容】

【0015】(エレクトロポレーションによる遺伝子導入) 上記で得たプロトプラストを濃度が 2.5×10^6 細胞/mL になるようにエレクトロポレーション緩衝液(5 mM MES pH5.8, 70 mM KCl, 0.3 M マニトール)に再懸濁する。エレクトロポレーション用キュベット(ジーンパルサーキュベット 0.4 cm electrode, バイオラッド社製)に構築したpGAL4-LUCレポーター遺伝子とエフェクタープラスミドとしてpGALDB-osERF3あるいはそのデレーションシリーズ(pGALDB-1/25osERF3~pGALDB-204-225osERF3)のDNAを各10ugとリファレンス遺伝子プラスミド1ugを100 uLの2Xエレクトロポレーション緩衝液(10 mM MES pH5.8, 140 mM KCl, 0.6 M マニトール)を加えて、滅菌水で全量を200 uLにする。キュベットに600uLのプロトプラスト懸濁液を入れて、エレクトロポレーター(Genepulser II Electroporation System/バイオラッド社製)を用いて600 V, 25 mFの条件でDNAを導入する。導入後、キュベットからプロトプラストを1,000 rpmで5分間遠心して回収し、5 mLの0.4 M マニトールを含むMS培地にプロトプラストを再懸濁して、26℃で6時間暗所で静置した後、レポーター遺伝子の活性を測定した。

フロントページの続き

(51) Int. Cl. 7

識別記号

F I

ターマコード(参考)

C 1 2 N 1/21
5/10C 1 2 N 15/00
5/00Z N A A
A

Fターム(参考) 2B030 AA02 AB03 AD20 CA06 CA17
CA19 CB03
4B024 AA08 BA80 CA04 DA01 EA04
FA02 GA14 GA21 HA01 HA14
4B065 AA88Y AA89X AB01 AC14
BA03 CA24 CA53
4H045 AA10 CA31 DA45 EA05 FA74

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.